

Studies on the protective components in a ribonuclease sensitive ribosomal vaccine of *pseudomonas aeruginosa*

Citation for published version (APA):

Kolfschoten-Gonggrijp, R. (1982). *Studies on the protective components in a ribonuclease sensitive ribosomal vaccine of pseudomonas aeruginosa*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19820101rk>

Document status and date:

Published: 01/01/1982

DOI:

[10.26481/dis.19820101rk](https://doi.org/10.26481/dis.19820101rk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary.

In this thesis the immunological effects of a ribosomal vaccine of Pseudomonas aeruginosa are analyzed.

Fatal pseudomonas infections occur in patients with burns, cancer patients and patients with cystic fibrosis. Attempts have been made to protect burn patients with a pseudomonas vaccine containing lipopolysaccharide (LPS), a cell envelope component of this bacterium. The application of such vaccines to cancer patients was limited, however, because of the toxicity of these vaccines. Since LPS bears the serotype specific O antigens, these vaccines had to contain LPS of each of the (frequently occurring) serotypes of P. aeruginosa.

From many microorganisms, ribosome-rich preparations were isolated which protected experimental animals, usually mice, against a lethal homologous challenge. Some of the ribosomal vaccines had advantages over more conventional vaccines because of the low toxicity of the ribosomal preparations, or the capacity to induce cross protection against different serotypes of the bacterium. These two properties in particular were attractive for a vaccine of P. aeruginosa.

In all studies concerning ribosomal vaccines a central question has been how ribosomes could induce protection. Since immunity results from the host's capacity to recognize the cell surface antigens of the invading microorganism, it is not clear how ribosomes which reside inside the microorganism could stimulate those lymphocytes which bear receptors for the cell envelope antigens. Although the pioneering studies of Youmans and Youmans on the ribosomal vaccine of Mycobacterium tuberculosis demonstrated convincingly that the protective activity of this vaccine was due to ribonucleic acid (RNA), later studies on ribosomal preparations often showed that cell envelope components contaminated the ribosomes and that these surface antigens were responsible for the protective activity. Only in case of a few ribosomal vaccines indications were found that the protective activity was dependent on RNA since the activity of the vaccine was decreased after treatment with ribonuclease (RNase). Most of the RNase sensitive ribosomal vaccines appeared to be prepared from intracellular multiplying microorganisms.

In this thesis the components in the ribosomal vaccine of P. aeruginosa which contributed to its protective activity and the mechanism via which the protection was exerted, were analyzed.

In Chapter 4 the purification and chemical composition of a RNase sensitive ribosomal preparation of P. aeruginosa are described. By column chromatography a cell envelope fraction (fraction I) was separated from the ribosomes (fraction II). Subcutaneously injected ribosomes induced some protection against a lethal challenge with P. aeruginosa, which was injected intraperitoneally 6 days later. The protection improved when the ribosomes were mixed with the adjuvant dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) prior to injection. The protective activity of the ribosomal vaccine was reduced after treatment with RNase, but not after treatment with proteases. Since the ribosomal vaccine was RNase sensitive, RNA had a function in the protective activity of the vaccine. Two possibilities were considered. RNA might be an adjuvant for contaminating cell surface antigens, or RNA itself might induce protection.

In Chapter 5 the possibility that RNA functioned as an adjuvant is studied by looking for the presence of contaminating cell surface antigens in the ribosomal preparation. With an enzyme-linked immunosorbent assay antibodies to LPS could be detected in sera of rabbit and mice which were injected with ribosomes. Several experiments demonstrated that contaminating LPS in the ribosomal preparation contributed to the protective activity by the induction of anti-LPS antibodies. The contribution of another component than LPS to the protective activity of the ribosomes was suggested by the finding that the ribosomes induced higher percentages of survival at certain titers of anti-LPS antibodies than purified LPS. It also appeared that the decreased activity of RNase treated ribosomes could be restored by the addition of synthetic polyadenylic-polyuridylic acid, which is well known for its adjuvant activity. The protective activity and the toxicity of the ribosomes, fraction I and purified LPS were compared. A therapeutic index was calculated which indicates the toxicity of that dose of vaccine that gives a certain degree of protection. According to this criterium, the ribosomes and fraction I were less toxic than purified LPS.

In Chapter 6 the function of RNA in the ribosomal vaccine is clarified. Therefore, the conditions for optimal protection by the ribosomal vaccine were determined first. Intraperitoneal injection of the ribosomes (i.e. via same route as the challenge was given) yielded better results than subcutaneous injection. The protection appeared as quickly as 1 day after injection of the ribosomes and lasted approximately 9 days. Since no anti-LPS antibodies were found 2 days after treatment with the ribosomes, the early protection could not be ascribed to LPS. The ribosomal vaccine protected mice against a heterologous challenge both 2 and 6 days after injection, while LPS did not induce cross protection.

Purified ribosomal RNA combined with DDA also protected mice as early as 1 day after injection and the protection was serotype-nonspecific. Protein isolated from the ribosomes did not protect mice.

The ribosomal vaccine was imitated by adding small amounts of LPS to RNA + DDA. When LPS was added to RNA + DDA, slightly higher titers of anti-LPS antibodies were induced than by LPS + DDA without RNA, which demonstrated the adjuvant function of RNA. Both RNA and LPS contributed to the protection since higher percentages of survival were induced when LPS was added to RNA + DDA, than by RNA + DDA or LPS + DDA alone. However, LPS contributed only to the protection in case of a homologous challenge. The contribution of RNA to the protective activity appeared also from the finding that preparations containing RNA + DDA and LPS induced higher percentages of survival at certain titers of anti-LPS antibodies, than LPS + DDA without RNA. It was concluded that RNA contributed to the protective activity of the ribosomes in 2 ways. RNA induced nonspecific protection as quickly as 1 day after injection and RNA served as an adjuvant for the LPS which contaminated the ribosomes.

Chapter 7 contains several control experiments which are all designed to establish that the protective activities which were ascribed to RNA could not be due to contaminating LPS or fragments of LPS. Many immunostimulating and immunomodulating activities have been ascribed to LPS, in particular to the lipid A part of this molecule. RNA + DDA did not induce significant anti-LPS antibody titers. With the sensitive Limulus test, LPS could be detected in the ribosomal preparations, but not in the purified RNA.

Inbred mice, which were insensitive for the immunologic activities of LPS were equally well protected by RNA + DDA as LPS sensitive mice. A mutant strain of P. aeruginosa which contained a defective LPS without carbohydrate side chains was used to demonstrate that the lipid A part of LPS had no protective activity. The RNA from the mutant and the RNA from the wild type parent strain induced low, but similar protection. RNA isolated from P. aeruginosa protected mice also against challenge with Escherichia coli and ribosomal RNA's from E. coli and Saccharomyces cerevisiae protected against P. aeruginosa challenge. Yeast does not contain LPS. Ribosomal RNA appeared to protect even when it was partially degraded. In contrast, RNA from the E. coli phage MS2 did not protect mice against P. aeruginosa infection.

The experiments clearly demonstrated that the protective activities of RNA were not due to LPS or fragments of LPS in the preparation. Which properties of RNA are decisive for the protective activity of the preparation remained to be elucidated.

Chapter 8 deals with the question how RNA induced nonspecific protection in the host. Since RNA protected as quickly as one day after injection, the protection was probably not due to antibodies or cellular immunity. This presumption was affirmed by the finding that protection induced by RNA + DDA could not be transferred with serum. The amount of resistance which was induced by RNA + DDA was quantitatively compared with the resistance induced by DDA or physiologic saline by comparing the doses of P. aeruginosa, which were lethal, for 50% of the treated mice (LD_{50}). Intraperitoneal injection of DDA alone increased the resistance of mice for P. aeruginosa; addition of RNA to DDA increased the LD_{50} 2.5 fold more. Injection of RNA + DDA via different routes demonstrated that intraperitoneal administration induced much better protection against an intraperitoneally injected challenge than subcutaneous or intravenous administration. Indications were found that RNA + DDA, but not DDA alone, slightly increased the systemic resistance of the host as well. Intraperitoneal injection of only DDA resulted in the attraction of large numbers of peritoneal cells. After injection of RNA + DDA still higher numbers of peritoneal cells were found, in particular polymorphonuclear leukocytes (PMNLs).

An in vivo phagocytosis system has been developed to find out whether the increased resistance of mice could be ascribed to an increased phagocytic capacity of the host due to the increased number of peritoneal cells, or to an increased activity of phagocytic cells of treated mice. The experiments did not yield support for the latter supposition. A higher number of cells in the peritoneal cavity took up a higher percentage of injected bacteria. However, the uptake of bacteria did not increase proportionally with the number of phagocytes since a lower bacteria to cell ratio also resulted in a lower number of ingested bacteria per cell. A lower number of bacteria per cell seemed to result in a better killing of the ingested bacteria. Since the phagocytosis experiments were performed with opsonized bacteria, it is not sure whether the results apply without modification to the situation in the protection experiments where no anti-LPS antibodies were present. However, the experiments suggested that the resistance induced by RNA + DDA was in part due to the attraction of phagocytic cells.

RNA + DDA did not induce interferon in the peritoneal fluid of mice and injection of interferon did not increase the resistance of mice against P. aeruginosa.

The discussion in Chapter 9 is concentrated on the question whether the results of these studies apply to the ribosomal vaccines which have been described in literature. In particular, the question is discussed whether different ribosomal vaccines also might be capable to induce nonspecific resistance, and whether RNA

in these vaccines might have an adjuvant function. Finally, the perspectives for the application of a ribosomal vaccine of P. aeruginosa to patients are considered.

Samenvatting.

In dit proefschrift wordt de analyse van de immunologische activiteit van een ribosomaal vaccin van Pseudomonas aeruginosa beschreven.

Pseudomonas infecties met dodelijke afloop komen voor bij patiënten met brandwonden, kankerpatiënten en patiënten met cystic fibrosis. Er zijn pogingen gedaan om brandwond patiënten te beschermen met een pseudomonas vaccin dat lipopolysaccharide (LPS), een cel envelop bestanddeel van deze bacterie, bevatte. De toepassingsmogelijkheden voor deze vaccins bij kanker patiënten waren echter beperkt omdat de vaccins toxisch waren. Aangezien LPS de serotype specifieke O antigenen draagt, moesten deze vaccins LPS van alle (veel voorkomende) serotypen van P. aeruginosa bevatten.

Uit vele microorganismen zijn ribosoomrijke preparaten geïsoleerd die proefdieren, meestal muizen, beschermden tegen een dodelijke, homologe infectie. Sommige ribosomale vaccins hadden voordelen boven de meer conventionele vaccins vanwege de geringe toxiciteit van het ribosomale preparaat of het vermogen om kruisbescherming op te wekken tegen verschillende serotypen van de bacterie. Juist deze twee eigenschappen waren aantrekkelijk voor een vaccin van P. aeruginosa.

In alle onderzoeken naar ribosomale vaccins heeft de vraag hoe ribosomen bescherming konden induceren, centraal gestaan. Aangezien immuniteit het gevolg is van het vermogen van de gastheer om de oppervlakte antigenen van het binnendringende microorganisme te herkennen, is het niet duidelijk hoe ribosomen, die binnen in het microorganisme zitten, die lymphocyten kunnen stimuleren die receptoren dragen voor de cel envelop antigenen.

Hoewel de baanbrekende onderzoeken van Youmans en Youmans naar het ribosomale vaccin van Mycobacterium tuberculosis overtuigend aantoonde dat de beschermende activiteit van dit vaccin te danken was aan ribonucleïne zuur (RNA), toonden latere onderzoeken naar andere ribosomale preparaten vaak aan dat cel envelop bestanddelen de ribosomen verontreinigden en dat deze oppervlakte antigenen verantwoordelijk waren voor de beschermende activiteit. Slechts voor enkele ribosomale vaccins werden aanwijzingen gevonden dat de beschermende activiteit afhankelijk was van RNA aangezien de activiteit van het vaccin verminderd was na behandeling met ribonuclease (RNase). De meeste RNase gevoelige ribosomale vaccins bleken bereid te zijn van zich intracellulair vermenigvuldigende microorganismen.

In dit proefschrift is nagegaan welke bestanddelen van het ribosomale vaccin van P. aeruginosa bijdroegen tot de beschermende activiteit van dit vaccin en via welk mechanisme de bescherming

werd uitgeoefend.

In hoofdstuk 4 worden de zuivering en de chemische samenstelling van een RNase gevoelig ribosomaal preparaat van P. aeruginosa beschreven. Door kolom chromatografie werd een cel envelop fractie (fractie I) van de ribosomen (fractie II) gescheiden. Subcutaan ingespoten ribosomen wekten enige bescherming op in muizen tegen een dodelijke infectie met P. aeruginosa die 6 dagen later intraperitoneaal werd ingespoten. De bescherming verbeterde wanneer de ribosomen gemengd werden met het adjuvans dimethyldioctadecylammonium bromide (DDA) voor het inspuiten. De beschermende activiteit van het ribosomale vaccin werd verminderd na behandeling met RNase, maar niet na behandeling met eiwit splitsende enzymen. Aangezien het ribosomale vaccin gevoelig was voor RNase heeft RNA een functie in de beschermende activiteit van het vaccin. Er zijn twee mogelijkheden overwogen: RNA zou een adjuvans kunnen zijn voor verontreinigende cel oppervlakte antigenen, of RNA zou zelf bescherming kunnen opwekken.

In hoofdstuk 5 is de mogelijkheid dat RNA als een adjuvans functioneerde bestudeerd door te kijken of er verontreinigende cel oppervlakte antigenen in het ribosomale preparaat aanwezig waren. Met een enzyme-linked immunosorbent testsysteem konden antilichamen tegen LPS aangetoond worden in de sera van met ribosomen ingespoten konijnen en muizen. Verschillende experimenten maakten duidelijk dat verontreinigend LPS in het ribosomale preparaat bijdroeg tot de beschermende activiteit doordat het antilichamen tegen LPS opwekte.

De waarneming dat de ribosomen hogere overlevings percentages veroorzaakten bij bepaalde anti-LPS titers dan gezuiverd LPS deed vermoeden dat er nog een ander bestanddeel dan LPS tot de beschermende activiteit van de ribosomen bijdroeg. Verder bleek dat de verminderde activiteit van met RNase behandelde ribosomen hersteld kon worden door toevoeging van synthetisch polyadenosine-polyuridine zuur, waarvan bekend is dat het adjuvans activiteit heeft. De beschermende activiteit en de toxiciteit van de ribosomen, fractie I en gezuiverd LPS zijn vergeleken. Er werd een therapeutische index berekend die de toxiciteit van die dosis vaccin aangeeft die een bepaalde mate van bescherming geeft. Volgens dit criterium waren de ribosomen en fractie I minder toxisch dan gezuiverd LPS.

In hoofdstuk 6 is de functie van RNA in het ribosomale vaccin verduidelijkt. Daartoe werd eerst bepaald onder welke omstandigheden optimale bescherming door het ribosomale vaccin werd opgewekt. Er werden betere resultaten verkregen wanneer de ribosomen intraperitoneaal (dat is via dezelfde weg als de infectie) werden toegediend dan wanneer ze subcutaan werden ingespoten. De bescher-

ming trad al 1 dag na het inspuiten van de ribosomen op en duurde ongeveer 9 dagen. Aangezien er 2 dagen na de behandeling met ribosomen geen anti-LPS antilichamen werden gevonden, kon de vroege bescherming niet aan LPS worden toegeschreven. Zowel 2 als 6 dagen na het inspuiten beschermde het ribosomale vaccin muizen tegen een heterologe infectie terwijl LPS geen kruisbescherming gaf. Gezuiverd ribosomaal RNA dat met DDA gemengd was, beschermde muizen ook al 1 dag na het inspuiten en de bescherming was niet serotype-specifiek. Eiwit dat uit de ribosomen geïsoleerd werd, beschermde de muizen niet.

Het ribosomale vaccin werd geïmmiteerd door kleine hoeveelheden LPS aan DDA + RNA toe te voegen. Wanneer LPS aan DDA + RNA toegevoegd was, werden iets hogere anti-LPS titers opgewekt dan door LPS + DDA zonder RNA, hetgeen de adjuvans functie van RNA aantoonde.

Zowel LPS als RNA droegen bij tot de bescherming want er werden hogere overlevings percentages gevonden wanneer LPS aan RNA + DDA was toegevoegd dan dat er door RNA + DDA of LPS + DDA werden veroorzaakt. LPS droeg echter alleen bij tot de bescherming in geval van een homologe infectie. De bijdrage van RNA aan de beschermende activiteit bleek ook hieruit dat preparaten die RNA + DDA en LPS bevatten bij bepaalde anti-LPS titers hogere overlevings percentages veroorzaakten dan LPS + DDA zonder RNA. Er werd geconcludeerd dat RNA op 2 manieren aan de beschermende activiteit van de ribosomen bijdroeg. RNA wekte al 1 dag na injectie niet-specifieke bescherming op en RNA diende als adjuvans voor het LPS dat de ribosomen verontreinigde.

Hoofdstuk 7 bevat verscheidene controle experimenten die allemaal opgezet zijn om vast te stellen dat de beschermende activiteiten die aan RNA toegeschreven waren, niet te wijten konden zijn aan verontreinigend LPS of LPS-fragmenten. Er zijn veel immunostimulerende en immunomodulerende activiteiten aan LPS toegeschreven, vooral aan het lipid A deel van dit molecuul.

RNA + DDA wekte geen noemenswaardige anti-LPS titers op. Met de gevoelige Limulus test kon LPS aangetoond worden in het ribosomen preparaat maar niet in het gezuiverde RNA.

Ingeteelde muizen die ongevoelig waren voor de immunologische activiteiten van LPS werden even goed door RNA + DDA beschermd als muizen die voor LPS gevoelig waren. Een mutant stam van P. aeruginosa die een defect LPS zonder koolhydraat ketens had, werd gebruikt om aan te tonen dat het lipid A deel van LPS geen beschermende activiteit had. Het RNA van de mutant en het RNA van de normale ouder stam wekte lage, maar gelijke bescherming op. RNA dat uit P. aeruginosa geïsoleerd was, beschermde muizen ook tegen een Escherichia coli infectie en ribosomale RNA's van E. coli en Saccharomyces cerevisiae beschermden tegen een P. aeruginosa infectie. Gist bevat geen LPS. Ribosomaal RNA bleek zelfs te

beschermen wanneer het gedeeltelijk afgebroken was. Het RNA van de E. coli phaag MS2 daarentegen beschermde muizen niet tegen een P. aeruginosa infectie.

De experimenten toonden duidelijk aan dat de beschermende activiteiten van RNA niet te wijten waren aan LPS of LPS-fragmenten in het preparaat. Welke eigenschappen beslissend zijn voor de beschermende activiteit van een RNA preparaat zal echter nog opgehelderd moeten worden.

Hoofdstuk 8 gaat over de vraag hoe RNA niet-specifieke bescherming opwekt bij de gastheer. Aangezien RNA al 1 dag na het inspuiten bescherming gaf, was de bescherming waarschijnlijk niet het gevolg van antilichamen of cellulaire immuniteit. Deze veronderstelling werd bevestigd doordat bleek dat de bescherming die door RNA + DDA was opgewekt niet overgedragen kon worden met serum. De mate van weerstand die door RNA + DDA was opgewekt, werd kwantitatief vergeleken met de weerstand die door DDA of fysiologisch zout was opgewekt, door de doses van P. aeruginosa die dodelijk waren voor 50 procent van de behandelde muizen (LD_{50}) te vergelijken. Het intraperitoneaal inspuiten van alleen DDA verhoogde de weerstand van muizen voor P. aeruginosa; toevoeging van RNA aan DDA verhoogde de LD_{50} nog 2,5 maal. Door RNA + DDA via verschillende routes in te spuiten, werd aangetoond dat intraperitoneale toediening veel betere bescherming gaf tegen een intraperitoneaal ingespoten infectie dosis dan subcutane of intraveneuze toediening. Er zijn aanwijzingen gevonden dat RNA plus DDA ook de lichaamsweerstand van de gastheer in geringe mate verhoogde, terwijl DDA alléén dat niet deed. Het intraperitoneaal inspuiten van alleen DDA leidde tot de aantrekking van grote aantallen peritoneale cellen. Na het inspuiten van RNA + DDA werden nog grotere aantallen peritoneaal cellen gevonden, vooral polymorphonucleaire leukocyten (PMNLs).

Er is een in vivo fagocytose systeem ontwikkeld om na te gaan of de verhoogde weerstand van muizen toegeschreven kon worden aan een grotere fagocytose capaciteit van de gastheer als gevolg van het toegenomen aantal peritoneaal cellen, of aan een grotere activiteit van fagocyterende cellen van behandelde muizen. De experimenten gaven geen aanwijzing voor de laatste veronderstelling. Een groter aantal cellen in de peritoneaal holte nam ook een groter percentage van de ingespoten bacteriën op. De opname van bacteriën hield echter geen gelijke tred met het aantal fagocyten omdat een lagere verhouding van bacteriën tot cellen ook leidde tot een geringer aantal gefagocyteerde bacteriën per cel. Een lager aantal bacteriën per cel leek ook een betere doding van de opgenomen bacteriën tot gevolg te hebben. Het is niet zeker of de resultaten van deze experimenten zonder meer toe te passen zijn op de experimenten waarin bescherming bepaald werd, omdat de fagocytose experimenten uitgevoerd werden met geopsoniseerde bacte-

riën, terwijl bij de beschermings experimenten geen anti-LPS antilichamen aanwezig waren.

De experimenten ondersteunden echter het idee dat de weerstand die door RNA + DDA was opgewekt gedeeltelijk het gevolg was van het aantrekken van phagocyterende cellen. RNA + DDA wekte geen interferon op in het peritoneaal vocht van muizen en het inspuiten van interferon leidde niet tot verhoging van de weerstand van muizen tegen P. aeruginosa.

De discussie in hoofdstuk 9 is geconcentreerd rond de vraag of de resultaten van dit onderzoek van toepassing zijn op de ribosomale vaccins die in de literatuur beschreven zijn. Er is vooral aandacht gegeven aan de vraag of andere ribosomale vaccins ook in staat zouden zijn om niet-specifieke weerstand te induceren, en of RNA in deze vaccins ook een adjuvans functie zou kunnen hebben. Tenslotte is overwogen welke de perspectieven zijn voor de toepassing van een ribosomaal vaccin van P. aeruginosa bij patiënten.